

## 【研究紹介】

## エクソソームの生理的機能の解明に向けた基盤技術の開発

## Development of fundamental technology to reveal physiological functions of exosomes

金沢大学医薬保健研究域医学系 免疫学  
吉田 孟史, 華山 力成

## はじめに

近年、様々な細胞がエクソソームと呼ばれる直径30-100 nmの膜小胞を放出することにより、情報を伝達する可能性が注目されている。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、多胞性エンドソームと呼ばれる細胞内小胞の中で産生され、多胞性エンドソームが細胞膜と融合することにより細胞外へと放出される。エクソソームには、エンドソーム由来の蛋白質 (ESCRTなど) や細胞内輸送に関与する蛋白質 (Rab GTPaseなど)、細胞膜由来の蛋白質 (CD63, CD81など) をはじめ様々な分泌細胞由来の蛋白質が含まれているとともに、分泌細胞の細胞膜やエンドソーム膜由来の脂質 (ホスファチジルセリンやスフィンゴミエリンなど)、核酸 (mRNAやmiRNA) などが含まれている<sup>1)</sup>

長年エクソソームは不要となった細胞内成分を細胞外へと放出する為の機構として考えられてきたが、近年、分泌細胞と標的細胞との間で様々な蛋白質や脂質、核酸を交換する重要な媒体であることが明らかとなっている。特に、免疫細胞由来のエクソソームには抗原ペプチド/MHC複合体や様々な抗原が含まれていることが示されており、免疫細胞間での抗原情報の交換や、免疫細胞の活性化・不活性化など様々な免疫応答を制御する可能性が示されている<sup>2)</sup>。しかしながら、これまでの研究では生体内において内在性のエクソソームの機能を解析した研究は行われておらず、ほとんどの実験において、不純物を多く含む条件下で精製したエクソソームを生体内に多量に打ち込むといった非生理的な研究が行われている。

そこで私たちはまず、高純度のエクソソームを精製する技術を開発することで、エクソソーム本来の生理機能の解析を目指している。次に、特定の細胞においてエクソソームの産生に障害を持つマウスの開発を行うことで、生理的な条件下における内在性のエクソソームの機能解明を目指している。本稿ではこれらの研究について紹介する。

## 1. 高純度エクソソーム精製法の開発

現在、広く用いられているエクソソーム精製方法として、超遠心法あるいはアフィニティー精製法が知られている。超遠心法は数回の遠心により細胞や細胞断片を取り除いた上清を100,000 × gで2時間超遠心することでエクソソームを沈降物として精製する方法である<sup>3)</sup>。しかし、この方法で得られるエクソソームには、凝集した蛋白質などが不純物として多く含まれており、エクソソ

ームの投与によって得られる効果が本当にエクソソームの機能によるものであるかは判然としない。一方、アフィニティー精製法では、エクソソームの表面マーカーに対する抗体を結合させた磁気ビーズを用いてエクソソームを捕捉する<sup>4)</sup>。洗浄を繰り返すことで、非常に純度の高いエクソソームを精製することが可能であるが、抗体とエクソソームの結合が強力な為、活性を保持したままエクソソームを抗体から遊離させることは不可能である。また、全てのエクソソームに共通するマーカーが現時点では知られていないことから、特定のエクソソームしか回収することができないことも問題である。

私たちはリン脂質の1種ホスファチジルセリンの特異的な受容体であるTIM4蛋白質と磁気ビーズを結合させることで、上述の課題を解決した新たなエクソソーム精製法 (TIM4-affinity法) を開発した<sup>5)</sup>。TIM4は、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下でホスファチジルセリンと強固に結合するが、非存在下では解離する性質をもつ<sup>6)</sup>。エクソソームの膜表面にはホスファチジルセリンが多く露出しており<sup>7)</sup>、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下でTIM4と結合することが可能である。洗浄を行った後に、Ca<sup>2+</sup>イオンをキレートするEDTAを添加することでTIM4磁気ビーズから高純度のエクソソームを遊離させることが可能である (図1)。実際私たちは、ヒト白血病由来細胞株K562細胞の培養上清に含まれるエクソソームをTIM4-affinity法で精製し、その純度

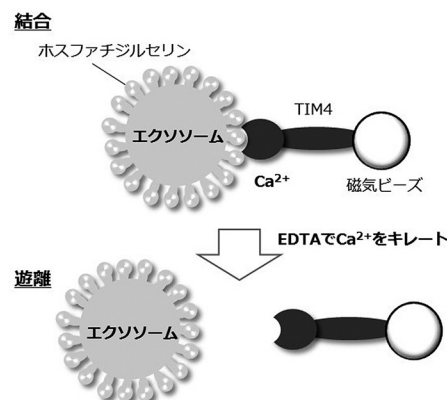


図1. TIM4-affinity 精製法

エクソソームの脂質二重膜の表面にはリン脂質ホスファチジルセリンが露出しており、Ca<sup>2+</sup>存在下でTIM4-磁気ビーズと結合する。洗浄によって夾雑物を除去した後に、EDTAでCa<sup>2+</sup>をキレートすることにより、エクソソームはTIM4磁気ビーズから遊離する。

を超遠心法などの従来の精製法と比較したところ、TIM4-affinity法では従来法に比べ、10-100倍以上高純度なエクソソームを精製することが可能であった。また、ナノ粒子解析装置NanoSIGHTを用いてエクソソームの粒子径を計測したところ、超遠心法で精製したエクソソームでは平均136 nmであったのに対して、TIM4-affinity法では106 nmであった。この結果は、超遠心法で精製したエクソソームでは一部が凝集し200 nm以上の粒子径として存在していることを示唆している。以上のように、TIM4-affinity精製法を用いることで、現在標準的なエクソソームの精製法である超遠心法に比べて、高品質のエクソソームを簡単に精製することが可能となった。さらに、TIM4-affinity法は血液や尿などの生体試料からのエクソソーム精製にも適応可能であり、今後、創薬研究や診断薬開発など様々な場面で利用されることが期待される。

## 2. 細胞特異的エクソソーム分泌障害マウスの作製

細菌などの異物が体内に侵入したときに最初に出会う免疫細胞は好中球やマクロファージ、樹状細胞などの自然免疫系の細胞である。細菌を認識した自然免疫系細胞はサイトカインやケモカインを分泌して感染部位にさらに多くの自然免疫系細胞を流入させる。また、細菌を貪食したマクロファージや樹状細胞は抗原ペプチド/MHC複合体を介してT細胞に細菌の情報を伝えることで、獲得免疫応答を誘導する。このように感染時において様々な免疫細胞はサイトカインやケモカイン、細胞表面分子などを介してコミュニケーションをとっているが、エクソソームを介したコミュニケーションが生体内でどのように行われているのかは、ほとんど明らかとなっていない。

これまでエクソソームの機能解析は、精製したエクソソームをマウスに投与することによりその機能の解明がなされてきたが、エクソソーム本来の生理的な機能を解明する為には、内在性のエクソソームを特定の細胞で欠損させたモデルマウスを樹立することが必要不可欠である。そこで私たちは、エクソソーム産生機構の一つである

ESCRT複合体に着目した。ESCRT複合体は20以上の蛋白質で構成される複合体で、後期エンドソームの膜を膜の内側に萌芽させ、100 nm前後の小胞の形成を促進する。その後、後期エンドソームは、多胞性エンドソームへと成熟し、これが細胞膜と融合することで、内包されている小胞がエクソソームとして細胞外へと分泌される。私たちは様々なESCRT複合体関連蛋白質を欠損させた細胞を樹立し、それぞれにおけるエクソソームの分泌量を測定した。その結果、ESCRT複合体の1つを欠損させた細胞ではエクソソーム分泌量が顕著に減少することを見出した。

このことから私達は、この分子のコンディショナルノックアウトマウスを作製することで、特定の細胞でのみ内在性のエクソソームの分泌を減少させることが可能であると考えている。そこで、マウス遺伝子のExon 4の前後にloxP配列を挿入したターゲティングベクターを作製し、マウスES細胞で相同組換えを行った。現在、キメラマウスの作製に成功している。今後は、好中球やマクロファージ特異的にCreリコンビナーゼを発現するLysM-Creマウスとこのマウスとを交配させることで、好中球やマクロファージ特異的なノックアウトマウスを作製し、自然免疫におけるエクソソームの生理的な機能を解析したいと考えている(図2)。

## おわりに

この数年間で免疫系だけでなく癌や神経疾患など様々な分野でエクソソームの新たな機能が次々と明らかとなり、エクソソーム研究は注目を集めつつある。しかしながら、多くの研究は培養細胞で行われており、エクソソームが生体内で本当に重要な役割を担っているのかは未だ解明されていない。また、一部の研究では不純物の多いエクソソームが用いられている場合や過剰量のエクソソームを投与している場合もある。私たちは今後、私達が樹立した高純度エクソソーム精製法や細胞特異的エクソソーム欠損マウスを用いることで、生体内におけるエクソソームの真の機能を明らかにすることを目指している。

## 文 献

- 1) Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Interacellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
- 2) Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* 2014; 5: 1-11.
- 3) Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: 1-29.
- 4) Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001; 247: 163-74.
- 5) Nakai W, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N, et al. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci Rep* 2016; 6: 33935.
- 6) Miyaniishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007; 450: 435-9.
- 7) Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; 319: 1244-7.

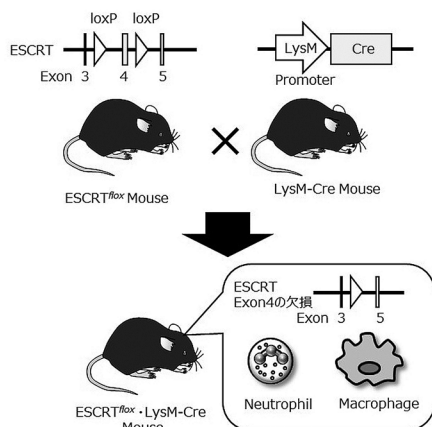


図2. 細胞特異的エクソソーム分泌障害マウス

ESCRT遺伝子のExon 4をLoxP配列で挟んだESCRT<sup>loxP/loxP</sup>マウスと好中球/マクロファージ特異的にCreを発現するLysM-Creマウスとを掛け合わせる。産まれるESCRT<sup>loxP/loxP</sup> · LysM-Creマウスでは好中球やマクロファージ特異的にESCRT遺伝子が欠損しており、エクソソーム分泌が減少する。